

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻

平成 21 年度博士課程入学

氏名 熊谷 勝義

指導教員 塩田 邦郎

論文題目 非コード・アンチセンス RNA による標的遺伝子
特異的エピジェネティック制御に関する研究

緒言

エピジェネティクスとは、「DNA の塩基配列の変化を伴わずに細胞分裂後も伝達される遺伝子機能の変化について探求する学問領域」を意味する。DNA メチル化はシトシンの 5 位の炭素にメチル基が付加される修飾で DNA メチル化酵素によって触媒される。哺乳類では CG 配列の C がメチル化されるのに対し、植物では、CG 配列に加え、CHG 配列および CHH 配列 (H は G 以外の塩基) の C にもメチル化が認められる。一方、いくつか知られるヒストンの翻訳後修飾は、様々な細胞機能制御に重要な役割を果たす。Sphk1 遺伝子の転写調節領域で発見された内在性 ASncRNA (Khps1) は、Sphk1 の T-DMR にオーバーラップする形で mRNA とは逆のアンチセンス方向へ転写される (Imamura T *et al.* 2004)。この内在性 ASncRNA は、Sphk1 遺伝子が発現しているアレルでは発現せず、逆に Sphk1 遺伝子が発現していないアレルで発現する。一方で、内在性 ASncRNA の発現ベクターを導入して人為的に過剰発現させると、本来 T-DMR が高メチル化であった培養細胞で Sphk1 遺伝子の T-DMR は領域特異的に脱メチル化される (Imamura T *et al.* 2004)。つまり、内在性 ASncRNA 量を人為的に変化させることで特定のゲノム領域の DNA メチル化状況を変える事が出来る可能性を示唆している。一方、ポリコム複合体の一つである PRC2 を標的領域にリクルートすることによって、ヒストン修飾および PRC1 による更なる不活性化が誘導され、標的領域近傍の遺伝子がエピジェネティックに不活性化されるものがある (Hekimoglu B & Ringrose L 2009; Jovanovic J *et al.* 2010)。しかし、これらの内在性 ASncRNA については、細胞のガン化に伴って ncRNA の発現が異常になるものや、染色体 DNA の転座や欠失を伴う ncRNA 自体の配列異常が多く見受けられる。以上より、ゲノムから転写されるアンチセンス RNA を始めとした多数の ncRNA が、正常な細胞分化や個体発生過程においても、遺伝子発現制御機構としてエピジェネテ

ニック制御に関わるかどうかを明らかにすることが必要である。

in vivo において内在性 ASncRNA による遺伝子発現制御について明らかとなれば、RNA 医薬などの新規創薬や病気の新規治療法確立などにつながる可能性がある。本研究では、データベース情報を基に内在性 ASncRNA を探索し、得られた内在性 ASncRNA の機能や役割を知るために in vitro および in vivo 機能解析を行った。第一章では、データベース情報を基にした T-DMR の DNA メチル化を制御する可能性のある内在性 ASncRNA の探索を行った。第二章では、Sall4 領域の内在性 ASncRNA による遺伝子制御同定と in vitro における機能解析を行った。第三章では、内在性 ASncRNA の in vivo における機能解析を行った。

第一章 T-DMR の DNA メチル化制御に関与する内在性 ASncRNA 候補の探索

本章では、胚性幹細胞である ES 細胞の多能性維持や細胞分化および個体形成に重要な遺伝子群に注目し、エピジェネティックな活性化状態を操れる候補となりうる内在性 ASncRNA を持つ遺伝子の探索を行った。まず、ES 細胞の多能性を維持するマスター転写因子の転写調節領域より strand-specific RT-PCR 法で内在性 ASncRNA の検出を行った。その結果、Nanog および Sox の転写調節領域に UCSC マウスゲノムブラウザに登録されていない新たな内在性 ASncRNA を発見した。さらに、データベースを利用することで転写調節領域に内在性 ASncRNA を持つ 6 つの遺伝子群を新たに検出した。これらは、T-DMR のメチル化パターンと内在性 ASncRNA 発現および mRNA 発現に一定のパターンがあることが示された。

第二章 培養細胞系を用いた Sall4 領域の内在性 ASncRNA による遺伝子制御作用

第一章で見出された 8 つの遺伝子の中の Sall4 遺伝子には、第一イントロンから転写開始点上流に向かって、アンチセンス方向の EST が登録されている。しかし、登録されている EST は本章で同定した T-DMR とはオーバーラップしていなかった。そこでこの EST が T-DMR の領域を含んで転写されているか確認するために、T-DMR 内に逆転写用の RT プライマーを設定して cDNA を合成し、strand-specific RT-PCR で T-DMR にオーバーラップする Sall4 内在性 ASncRNA の検出を行った。その結果、ES 細胞で転写され、且つ、T-DMR にオーバーラップする ASncRNA が検出された。このから、Sall4 内在性 ASncRNA は登録された EST の領域から T-DMR にオーバーラップして転写されていることが確認できた。次に、Sall4 ASncRNA の転写開始点を同定するために、FANTOM の転写開始点データベースの CAGE Tag を検索した。Sall4 ASncRNA の転写開始点と考えられる CAGE Tag を同定し、その CAGE Tag の場所から登録された EST 内の配列を strand-specific PCR で解析を行なった。その結果、CAGE Tag から登録された EST まで領域で ASncRNA が検出されたことから、Sall4 ASncRNA は CAGE Tag 部位から転写されることが示唆された。つぎに、in vitro における Sall4 内在性 ASncRNA と Sall4 mRNA との関係性を明らかにするために、siRNA 法を利用して Sall4 内在性 ASncRNA 発現の誘導的な低下を試みた。その結果、Sall4 内在性 ASncRNA 発現を一過性に低下させると、Sall4 promoter T-DMR や intronic T-DMR は高メチル化を示した。また、Sall4 mRNA の発

現や Sal14 タンパク発現、Sal14 と相互作用する Nanog, Oct4, Sox2 の mRNA 発現の低下が示された。さらに細胞の増殖能低下が示された。これらの結果から、Sal14 内在性 ASncRNA は Sal14 転写調節領域内 T-DMR の非メチル化状態を維持することで Sal14 mRNA 発現に影響を与えることが示唆された。

第三章 Sal14 領域に存在する内在性 ASncRNA を標的にした inducible shRNA のマウス初期胚発生への影響

Sal14 は ES 細胞の増殖や形質維持に関与することが報告されている (Sakaki M *et al.* 2006)。また、第二章で得られた結果からも、Sal14 内在性 ASncRNA はマウス初期胚発生へ関与していることが示唆された。そこで、Sal14 内在性 ASncRNA によるマウス初期胚発生への影響を調べるために、マウス初期胚の Sal14 内在性 ASncRNA 発現を低下させた。その結果、Sal14 内在性 ASncRNA 発現を低下に伴い、blastocyst への発生率が低下した。この結果から、Sal14 内在性 ASncRNA はマウスの個体でも Sal14 T-DMR の DNA メチル化状態を制御していることが考えられた。そこで、ドキシサイクリン添加による Sal14 内在性 ASncRNA 発現を誘導的に低下させるマウスを樹立し、妊娠初期の Sal14 内在性 ASncRNA による機能を解析した。その結果、Sal14 内在性 ASncRNA 発現の誘導的な低下により妊娠初期 (7.5dpc および 10.5 dpc) において胎仔の形態異常が観察された。このことから、Tg マウスより ES 細胞を樹立し、Sal14 のプロモーター T-DMR のメチル化パターンを検討した。その結果、Sal14 内在性 ASncRNA の発現を誘導的に低下させた Tg 由来 ES 細胞では、Sal14 のプロモーター T-DMR のメチル化が亢進した。これらの結果から、Sal14 内在性 ASncRNA は Sal14 のプロモーター T-DMR を非メチル化状態に維持していることが示唆された。

総括

本研究では、T-DMR にオーバーラップする内在性 ASncRNA を持つ遺伝子群を検出・解析し、低メチル化状態では内在性 ASncRNA 発現および mRNA 発現が高く、高メチル化状態では内在性 ASncRNA 発現および mRNA 発現が低い遺伝子群と、低メチル化状態では内在性 ASncRNA 発現および mRNA 発現が低く、高メチル化状態では内在性 ASncRNA 発現および mRNA 発現が高い遺伝子群に分類した。その中で、Sal1 領域の内在性 ASncRNA は Sal14 転写調節領域内 T-DMR の非メチル化状態を維持することで Sal14 mRNA 発現に影響を与えることが示唆された。さらに Sal14 内在性 ASncRNA はマウスの初期胚発生時期に非メチル化状態を維持していることが示され、Sal14 内在性 ASncRNA は発生や個体形成に重要な役割を持つことが考えられた。さらに、展望としては内在性 ASncRNA による狙った遺伝子のエピジェネティックな活性化状態を個体レベルで自在に操れる可能性が示唆された。従来の研究は、*in vitro* における内在性 ASncRNA の研究が中心となり、エピジェネティクスを中心に内在性 ASncRNA の機能が明らかにされてきた。これらの発見は、内在性 ASncRNA を介した新たなエピジェネティクス制御系の存在を意味し、新たな病態モデル動物の樹立へつながるのである。